

Метилирование 10 генов микроРНК при светлоклеточном раке почки и их диагностическое значение

В.И. Логинов^{1, 2}, Е.В. Береснева³, Т.П. Казубская⁴, Э.А. Брага^{1, 2}, А.В. Карпукхин¹

¹ФГБНУ «Медико-генетический научный центр»; Россия, 115478 Москва, ул. Москворечье, 1;

²ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»;

Россия, 125315 Москва, ул. Балтийская, 8;

³ФГБУ «Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов»;

Россия, 117545 Москва, 1-й Дорожный проезд, 1;

⁴ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России;

Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 23

Контакты: Александр Васильевич Карпукхин karpukhin@med-gen.ru

Введение. Светлоклеточный почечно-клеточный рак почки (скПКР) характеризуется высокой частотой (30–40 %) случаев летальных исходов, которая при метастазировании достигает 90 %. Отсутствие эффективной диагностики на ранних стадиях заболевания указывает на необходимость поиска новых маркеров скПКР.

Цель работы — определение роли метилирования группы генов супрессорных микроРНК (миРНК) в патогенезе и прогрессировании скПКР и идентификация маркеров для диагностики скПКР и прогноза метастазирования.

Материалы и методы. Методом бисульфитной конверсии ДНК с последующей метилспецифичной полимеразной цепной реакцией определено изменение статуса метилирования 10 генов миРНК в образцах ДНК опухоли и парных гистологически неизмененных тканях 70 больных скПКР, а также в образцах ДНК тканей почки 19 умерших от неонкологических заболеваний. Метилирование генов MIR-107, -130b и -148a при скПКР в данной работе исследовано впервые.

Результаты. Показано, что 8 генов миРНК (MIR-9-1/3, -34b/c, -124a-1/2/3, -129-2, -130b) метилированы в опухолях скПКР с достоверно более высокой частотой, чем в парной гистологически неизменной ткани почки. Установлена значимая связь метилирования 4 генов миРНК (MIR-107, -124a-3, -129-2, -130b) с показателями прогрессирования скПКР (стадия, размер опухоли, степень дифференцировки), в том числе для генов MIR-107 и -129-2 — с метастазированием в лимфатические узлы или отдаленные органы. Связь метилирования генов MIR-107 и -130b с прогрессированием заболевания показана впервые. Составлены потенциальные системы маркеров для диагностики скПКР на основе биопсийного материала; по данным ROC-анализа 2 системы маркеров из 4 и 5 генов (MIR-9-1, -34b/c, -124a-3, -129-2; и с добавлением MIR-130b) характеризуются клинической чувствительностью 90 % и специфичностью 94 % (площадь под ROC-кривой 0,93 и 0,94 соответственно).

Заключение. Полученные результаты в дальнейшем лягут в основу разработки метода неинвазивной диагностики скПКР. Таким образом, показана связь метилирования ряда генов миРНК с патогенезом и прогрессированием скПКР и их потенциальное диагностическое значение.

Ключевые слова: светлоклеточный почечно-клеточный рак, метилирование, ген микроРНК, метастазирование, система маркеров

DOI: 10.17650/1726-9776-2017-13-3-27-33

Methylation of 10 miRNA genes in clear cell renal cell carcinoma and their diagnostic value

V.I. Loginov^{1, 2}, E.V. Beresneva³, T.P. Kazubskaya⁴, E.A. Braga^{1, 2}, A.V. Karpukhin¹

¹Research Center for Medical Genetics; 1 Moskvorech'e St., Moscow 115478, Russia;

²Institute of General Pathology and Pathophysiology; 8 Baltiyskaya St., Moscow 125315, Russia;

³State Research Institute for Genetics and Selection of Industrial Microorganisms; 1 Pervyy Dorozhnyy Proezd, 117545 Moscow, Russia;

⁴N.N. Blokhin National Medical Research Oncology Center, Ministry of Health of Russia;
23 Kashirskoe Shosse, Moscow 115478, Russia

Introduction. Clear cell renal cell carcinoma (ccRCC) is characterized by the high (30–40 % of cases) frequency of lethal outcomes which at metastasis reaches 90 %. Lack of efficient diagnostics at early stages of a disease indicates the need of searching on new ccRCC markers.

Objective: for definition of methylation role of some tumor suppressor microRNA (miRNA) genes in ccRCC pathogenesis and progression and marker identification for ccRCC diagnostics and metastasis predictions.

Materials and methods. The alterations of methylation status of 10 miRNA genes were determined by methylation specific polymerase chain reaction in tumor DNA samples and matched histologically unchanged tissues from 70 patients with ccRCC, as well as in DNA samples of kidney tissues from 19 post-mortal individuals without cancer history. Methylation of MIR MIR-107, -130b and -148a genes in ccRCC was studied for the first time.

Results. It was shown that 8 miRNA genes (MIR-9-1/3, -34b/c, -124a-1/2/3, -129-2, -130b) were methylated in ccRCC tumors with significantly higher frequency than in the matched histologically unchanged kidney tissues. It was established the association of methylation

of 4 miRNA genes (MIR-107, -124a-3, -129-2, -130b) with ccRCC progression (stage, tumor size, differentiation grade), including metastasis in the lymph nodes or distant organs, revealed for MIR-107 and -129-2. The association of MIR-107 and -130b methylation with progression of ccRCC is shown for the first time. Potential marker systems are made for ccRCC diagnostics using tumor biopsy; according to the ROC analysis, systems from 4 and 5 genes (MIR-9-1, -4b/c, -124a-3, -129-2/with addition of MIR-130b) are characterized by high clinical sensitivity of 90 % and specificity of 94 % (area under ROC curve 0.93 and 0.94).

Conclusion. The received results will form the basis of noninvasive ccRCC diagnostics further development. To conclude, it is shown the association of methylation of 9 miRNA genes with ccRCC pathogenesis and progression and its potential diagnostic value.

Key words: clear cell renal cell carcinoma, methylation, microRNA gene, metastasis, marker system

Введение

Почечно-клеточный рак, диагностируемый примерно у 90 % больных раком почки, характеризуется наиболее высоким уровнем смертности среди урогенитальных видов рака [1]. Ежегодно в мире выявляют 270 тыс. новых случаев почечно-клеточного рака и 116 тыс. летальных исходов [2]. Наиболее распространен (75–80 %) светлоклеточный почечно-клеточный рак (скПКР), который характеризуется более агрессивным течением, чем папиллярный и хромофобный типы, и высокой частотой (25–30 %) метастазирования, которая увеличивается после операции до 50 % [3]. Метастатический скПКР крайне устойчив к терапии — ответ на химио-, радио- и иммунотерапию отмечается не более чем у 10 % больных [4]. Показатели 5-летней выживаемости при наличии отдаленных метастазов снижаются до 9 % [4]. В России летальность спустя год после постановки диагноза составляет 16 % (по данным на 2015 г.) [5]. Отсутствие эффективной диагностики на ранних стадиях заболевания, а также повышение частоты летальных исходов и устойчивости к терапии при метастазировании показывают необходимость поиска новых биомаркеров для ранней диагностики скПКР и выявления метастазирования.

Гиперметилирование CpG-островков промоторных областей белоккодирующих генов, обладающих свойствами супрессоров опухолевого роста, часто выявляется в злокачественных опухолях и ассоциировано с подавлением экспрессии этих генов [6]. Гиперметилирование таких генов рассматривается как один из факторов развития опухоли и маркер раннего выявления онкологического заболевания.

МикроРНК (миРНК) — класс однокитевых некодирующих РНК длиной 19–25 нуклеотидов, участвует в регуляции белоккодирующих генов на посттранскрипционном уровне. Гены миРНК так же подвержены метилированию, как и гены, кодирующие белки [7]. Предполагается, что доля генов миРНК, регулируемых посредством метилирования CpG-островков, в 5–10 раз выше, чем структурных генов [8]. Гиперметилирование, инактивирующее гены супрессорных миРНК, выявлено как в гематологических, так и в солидных видах рака, включая острую миелоидную лейкемию, меланому, рак легкого, толстой кишки,

желудка, молочной железы и др. [9, 10]. Как показано ранее, в том числе авторами данной работы, профили гиперметилирования генов миРНК могут использоваться как потенциальные биомаркеры для диагностики и прогноза течения разных видов рака [11–14]. При этом анализ гиперметилирования генов миРНК при скПКР представлен единичными публикациями [14–16].

Цель исследования — определение профиля метилирования 10 генов супрессорных миРНК при скПКР с использованием представительной выборки образцов и оценка диагностических и прогностических характеристик гиперметилированных генов миРНК.

Материалы и методы

Образцы опухолей скПКР собраны и клинически охарактеризованы в НИИ клинической онкологии НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина. Анализировали парные образцы опухоли и гистологически неизменной ткани почки, полученные от 70 больных скПКР, и 19 образцов ткани почки от умерших от неонкологических заболеваний (обозначенных как «доноры»). Отбор образцов проводили, как описано ранее [15]. Клинико-гистологические характеристики образцов по TNM-классификации [17] приведены в табл. 1. Высокомолекулярную ДНК выделяли из ткани методом фенол-хлороформной экстракции.

Работа проведена с соблюдением принципов добровольности и конфиденциальности в соответствии с «Основами законодательства РФ об охране здоровья граждан», получено разрешение этического комитета НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина, а также информированное согласие больных.

Бисульфитную конверсию ДНК и метилспецифичную полимеразную цепную реакцию (МС-ПЦР) проводили, как описано ранее [18]. Праймеры и условия МС-ПЦР для исследуемых фрагментов генов миРНК взяты из [15, 19–21]. Для каждого гена анализировали от 3 до 6 CpG-динуклеотидов. МС-ПЦР выполняли на амплификаторе T100 Thermal Cycler (Bio-Rad, США) по программе: 1 цикл 95 °C, 5 мин; 35 циклов {95 °C, 10 с; температура отжига, 20 с; 72 °C, 30 с}; 1 цикл 72 °C, 3 мин. Ложноположительные результаты из-за неполной бисульфитной конверсии ДНК исключали на стадии подбора праймеров по отсутствию продукта МС-ПЦР на необработанной бисульфитом

Таблица 1. Обобщенные данные по клиническим характеристикам больных светлоклеточным почечно-клеточным раком почки ($n = 70$)Table 1. Pooled data on clinical characteristics of patients with clear cell renal cell carcinoma ($n = 70$)

Характеристика Characteristics	n	%
Клиническая стадия заболевания: Clinical stage of the disease:		
I	27	39
II	14	20
III	21	30
IV	8	11
Степень дифференцировки опухоли: Tumor grade:		
G ₁	18	26
G ₂	32	46
G ₃	20	28
Размер опухоли по TNM: Tumor size according to the TNM:		
T1	30	43
T2	18	26
T3/T4	22	36
Метастазы: Metastases:		
N0M0	50	71
N1–2/M1	20	29

Примечание. N – метастазы в регионарные лимфатические узлы; M – отдаленные метастазы.

Note: N – regional lymph node metastases; M – distant metastases.

ДНК. Препарат метилированной ДНК человека (#SD1131, Thermo Scientific, США) использовали как контроль для метилированного аллеля, а препарат ДНК человека (#G1471, Promega, США) – как контроль для неметилированного аллеля. Продукты ПЦР от разных генов разделяли одновременно с использованием 2 % агарозного геля.

Статистический анализ проводили с применением точного критерия Фишера в программе AtteStat. Изменения считали значимыми при $p \leq 0,05$. Оптимальные системы маркеров выбирали на основании критерия Йодена по результатам ROC-анализа, проведенного с помощью ресурса <http://www.biosoft.hacettepe.edu.tr/easyROC/>.

Результаты

Профиль гиперметилирования генов микроРНК при скПКР и его связь с прогрессированием заболевания. Результаты анализа метилирования 10 генов микроРНК (*MIR-9-1*, *-9-3*, *-34b/c*, *-107*, *-124a-1*, *-124a-2*, *-124a-3*, *-129-2*, *-130b*, *-148a*) при скПКР, полученные с помощью МС-ПЦР, приведены в табл. 2. Повышенная частота метилирования в образцах опухолей по сравнению

с гистологически неизменной тканью (условная норма) и образцами контрольных доноров выявлена для 9 генов (кроме *MIR-148a*). Причем для 8 генов (кроме *MIR-107*, *-148a*) различия статистически значимы ($p < 0,05$; с учетом поправки Бенджамини–Хохберга на множественные сравнения (см. табл. 2)). В тканях доноров частота метилирования большинства генов составила 0–10 % (0–2 образца из 19).

Данные по метилированию 9 отобранных генов (кроме *MIR-148a*) в 70 образцах опухолей скПКР сопоставлены с клинико-гистологическими их характеристиками. Частота метилирования 5 генов (*MIR-34b/c*, *-107*, *-124a-2*, *-129-2*, *-130b*) статистически значимо ($p < 0,05$) выше в образцах больных на поздних, более тяжелых клинических стадиях, чем на I–II стадиях (рис. 1). На уровне тенденции связь с клинической стадией выявлена также для гена *MIR-124a-3* (см. рис. 1). Однако с учетом поправки Бенджамини–Хохберга на множественные сравнения значения p статистически значимы для *MIR-107*, *-129-2*, *-130b*. Таким образом, значимая ассоциация с III–IV клиническими стадиями установлена для 3 этих генов.

Значимая связь частоты метилирования с низкой степенью дифференцировки опухолей скПКР показана для генов *MIR-107*, *-124a-3* и, а также на уровне тенденции для гена *MIR-130b* (рис. 2). Определена значимая ассоциация метилирования генов *MIR-124a-2* и *-130b* с размером опухоли (рис. 3) и выявлена значимая связь с наличием метастазов в регионарные лимфатические узлы или отдаленные органы для генов *MIR-107* и *-129-2*, а также на уровне тенденции для гена *MIR-130b* (рис. 4). Однако с учетом поправки Бенджамини–Хохберга на множественные сравнения ассоциация с низкой степенью дифференцировки

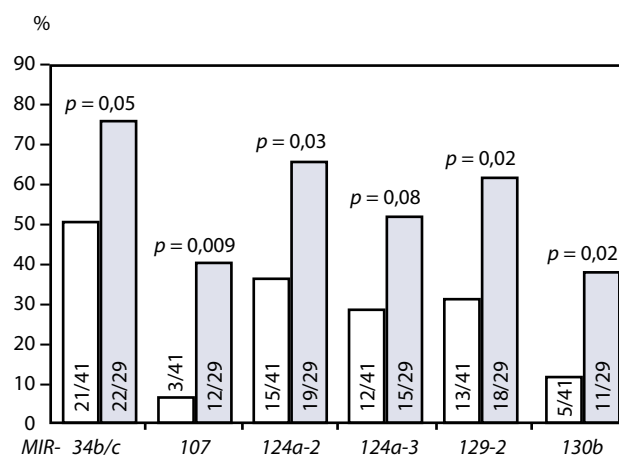


Рис. 1. Ассоциация метилирования генов микроРНК с клинической стадией светлоклеточного почечно-клеточного рака: стадии I/II – белый прямоугольник, III/IV – серый

Fig. 1. Association of microRNA gene methylation with the clinical stage of clear cell renal cell carcinoma: stage I/II is shown by a white rectangle; stage III/IV is by a gray rectangle

Таблица 2. Частота метилирования 10 генов микроРНК при светлоклеточном почечно-клеточном раке

Table 2. Frequency of methylation of 10 miRNA genes in clear cell renal cell carcinoma

Ген микроРНК MicroRNA gene	Локализация в геноме Location in genome	<i>p</i>	Доля (%) образцов, в которых данный ген микроРНК метилирован, от общего количества образцов Proportion (%) of samples with methylation of this MicroRNA gene of their total number		
			Опухолевая ткань (<i>n</i> = 70) Tumor tissue (<i>n</i> = 70)	Условно нормальная ткань (<i>n</i> = 70) Apparently intact tissue (<i>n</i> = 70)	Ткань почки доноров (<i>n</i> = 19) Kidney tissue of "donors" (<i>n</i> = 19)
MIR-9-1	1q22	$3,2 \times 10^{-5}$	29 (41)	7 (10)	0 (0)
MIR-9-3	15q26.1	0,0031	30 (43)	13 (19)	1 (5)
MIR-34b/c	11q23.1	$1,1 \times 10^{-8}$	43 (61)	10 (14)	1 (5)
MIR-124a-1	8p23.1	0,001	32 (46)	13 (19)	2 (10)
MIR-124a-2	8q12.3	0,0003	34 (49)	13 (19)	1 (5)
MIR-124a-3	20q13.33	$3,2 \times 10^{-6}$	27 (39)	4 (6)	0 (0)
MIR-148a	7p15.2	>0,05	25 (36)	37 (53)	9 (47)
MIR-129-2	11p11.2	$2,6 \times 10^{-10}$	31 (44)	1 (1)	0 (0)
MIR-130b	22q11.2	0,016	16 (23)	5 (7)	0 (0)
MIR-107	10q23.31	>0,05	15 (21)	6 (9)	1 (5)

Примечание. Условно нормальной ткани соответствует гистологически неизменная ткань почки от тех же пациентов. Доноры — умершие от неонкологических заболеваний. Статистически значимые значения *p* с учетом поправки Бенджамини—Хохберга на множественное сравнение выделены жирным шрифтом.

Note. Histologically unchanged kidney tissue from the same patients corresponds to apparently intact tissue. "Donors" are those dying of non-cancer diseases. The statistically significant *p*-values adjusted using the Benjamini—Hochberg procedure for multiple comparison are bold.

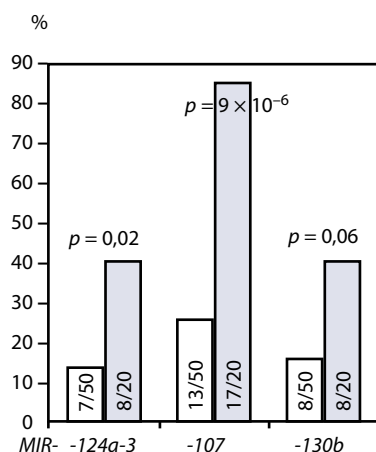


Рис. 2. Ассоциация метилирования генов микроРНК со степенью дифференцировки опухоли светлоклеточного почечно-клеточного рака: высоко- и умереннодифференцированный, $G_1 + G_2$ — белый прямоугольник; низкодифференцированный, G_3 — серый
Fig. 2. Association of microRNA gene methylation with clear cell renal cell carcinoma grade: low- and moderate-grades, $G_1 + G_2$ — a white rectangle; high-grade, G_3 — a gray rectangle

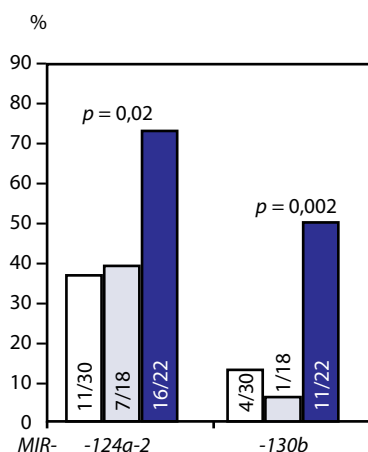


Рис. 3. Ассоциация метилирования генов микроРНК с размером опухоли светлоклеточного почечно-клеточного рака по TNM-классификации: T1 — белый прямоугольник; T2 — серый; T3/T4 — черный
Fig. 3. Association of microRNA gene methylation with the size of clear cell renal cell carcinoma according to the TNM classification: T1 — a white rectangle; T2 — a gray rectangle; T3/T4 — a black rectangle

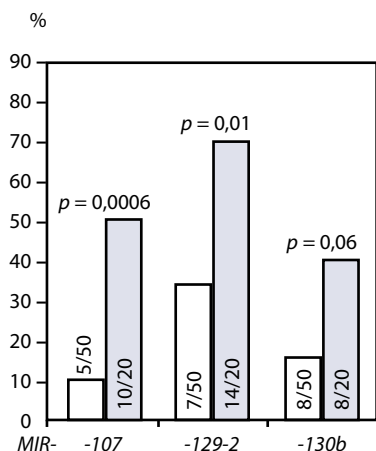


Рис. 4. Ассоциация метилирования генов микроРНК с метастазированием светлоклеточного почечно-клеточного рака: нет метастазов, N0M0 — белый прямоугольник; N1–2/M1 — серый (N — метастазы в регионарные лимфатические узлы, M — отдаленные метастазы)
Fig. 4. Association of microRNA gene methylation with metastases of clear cell renal cell carcinoma according to the TNM classification: N0M0 — a white rectangle; N1–2/M1 — a gray rectangle (N — regional lymph node metastases; M — distant metastases)

статистически значима для *MIR-124a-3*, с размером опухоли — для *MIR-130b*, с метастазированием — для *MIR-107* и *-129-2*.

Потенциальные диагностические системы маркеров скПКР. На основании полученных результатов о статусе метилирования 8 генов микроРНК в 70 образцах

опухолей при скПКР и в 19 образцах ткани почки от контрольных постмортальных лиц без онкопатологии в анамнезе нами составлены потенциальные диагностические системы маркеров для выявления скПКР из 4–5 генов микроРНК. Параметры для 4 систем, определенные методом ROC-анализа, приведены в табл. 3.

По данным ROC-анализа, эти системы позволяют диагностировать скПКР при выявлении метилирования хотя бы одного из данных генов (критерий отсека 1/4 или 1/5). Наборы маркеров из 4 и 5 генов (*MIR-9-1*, *-34b/c*, *-124a-3*, *-129-2*; и с добавлением *MIR-130b*) характеризуются клинической чувствительностью 90 %, специфичностью 94 % (площадь под ROC-кривой (area under ROC curve, AUC) 0,93 и 0,94 соответственно) и, по-видимому, оптимальны для диагностики скПКР среди изученных нами генов микроРНК.

Гены *MIR-107* и *-129-2*, метилирование которых значимо ассоциировано с метастазированием согласно данным ROC-анализа (не приведены), могут прогнозировать метастазирование с высокой чувствительностью, но недостаточно специфично.

Обсуждение

В данной работе изучено изменение статуса метилирования 10 генов микроРНК (*MIR-9-1*, *-9-3*, *-34b/c*, *-107*, *-124a-1*, *-124a-2*, *-124a-3*, *-129-2*, *-130b*, *-148a*) на представительной выборке парных образцов опухолей и гистологически неизмененных тканей почки

Таблица 3. Потенциальные диагностические системы маркеров на основе данных о метилировании 6 генов микроРНК

Table 3. Potential diagnostic systems of markers based on methylation of 6 miRNA genes

Система System	Набор генов микроРНК MicroRNA gene kit	Среднее значение площади под ROC-кривой (95 % доверительный интервал) The mean value of area under the ROC curve (95 % confidence interval)	Оптимальный критерий отсека Optimal cut-off criterion	Чувстви- тель- ность Sensitivity	Специ- фичность Specificity	Положитель- ное предска- зательное значение Positive predictive value	Отрицатель- ное предска- зательное значение Negative predictive value
№ 1 No. 1	<i>MIR-9-1</i> ; <i>-34b/c</i> ; <i>-124a-3</i> ; <i>-129-2</i>	0,93 (0,893–0,981)	1/4	0,900	0,944	0,984	0,708
№ 2 No. 2	<i>MIR-9-1</i> ; <i>-34b/c</i> ; <i>-124a-1</i> ; <i>-129-2</i>	0,90 (0,850–0,961)	1/4	0,871	0,833	0,953	0,625
№ 3 No. 3	<i>MIR-9-1</i> ; <i>-124a-3</i> ; <i>-129-2</i> ; <i>-130b</i>	0,89 (0,844–0,941)	1/4	0,786	1,000	1,000	0,545
№ 4 No. 4	<i>MIR-9-1</i> ; <i>-34b/c</i> ; <i>-124a-3</i> ; <i>-129-2</i> ; <i>-130b</i>	0,94 (0,899–0,981)	1/5	0,900	0,944	0,984	0,708

от 70 больных скПКР и тканей почки от 19 умерших от неонкологических заболеваний. Следует отметить, что метилирование 7 генов (*MIR-9-1*, *-9-3*, *-34b/c*, *-124a-1*, *-124a-2*, *-124a-3* и *-129-2*) было изучено нами ранее на меньшей выборке больных скПКР [15, 16]. Метилирование генов *MIR-107*, *-130b* и *-148a* при скПКР в данной работе исследовано впервые. Ранее для этих генов роль гиперметилирования была показана в патогенезе некоторых других видов рака. Например, *MIR-148a* был гиперметилирован при назофарингеальной карциноме, гепатоцеллюлярной карциноме и раке желудка [21–23]. Эпигенетическая инактивация *MIR-130b* найдена при раке яичников [20], а *MIR-107* — при раке поджелудочной железы [19], хотя не обнаружена при раке легкого и молочной железы [11, 12].

Данные о повышенной частоте метилирования большинства из 10 изученных генов миРНК, полученные в этой работе, указывают на онкосупрессорную функцию этих миРНК при скПКР. Данные по отсутствию существенных изменений статуса метилирования гена *MIR-148a* при скПКР позволяют предположить, что регуляция экспрессии этой миРНК не связана с метилированием. В пользу такого предположения свидетельствуют данные, указывающие на супрессорную роль миРНК *miR-148a* в патогенезе скПКР [24, 25].

Сопоставление результатов по метилированию генов миРНК с клинико-гистологическими характеристиками исследованных образцов скПКР позволило определить 4 гена миРНК, метилирование которых связано с прогрессированием скПКР: *MIR-107*, *-124a-3*, *-129-2* и *-130b*. Связь метилирования генов *MIR-124a-3* и *-129-2* с параметрами прогрессирования скПКР согласуется с нашими данными, полученными ранее [15, 16]. В данном исследовании впервые выявлена статистически значимая ассоциация метилирования гена *MIR-107* с поздней клинической стадией и метастазированием скПКР, а также гена *MIR-130b* — с поздней клинической стадией и увеличением размера опухолей.

Выявленное нами многократное повышение частоты метилирования в опухолях по сравнению с тканями почки постмортальных лиц без онкопатологии в анамнезе позволило нам составить эффективные

системы маркеров для диагностики скПКР. Две системы маркеров из 4 и 5 генов (*MIR-9-1*, *-34b/c*, *-124a-3*, *-129-2*; и с добавлением *MIR-130b*) характеризуются клинической чувствительностью 90 %, специфичностью 94 % (AUC 0,93 и 0,94 соответственно).

Ранее сообщалось о наборах гиперметилированных генов миРНК, ассоциированных с 11 видами рака, но не рака почки [9]. Возможность использования для диагностики последнего метилирования генов 7 миРНК (*MIR-9-1/3*, *-34b/c*, *-124a-1/2/3*, *-129-2*) рассмотрена в наших предыдущих статьях [15, 16]. Причем новая система маркеров, составленная в данной работе, охарактеризована более высокими показателями чувствительности и специфичности, чем предложенная нами ранее [16]. Другими авторами описаны системы, основанные на измерении уровня экспрессии миРНК, которые позволяют выявлять наличие опухолевых клеток, в том числе при анализе сыворотки крови пациентов при скПКР. Так, система из 2 миРНК (*miR-378* и *-451*) позволяет обнаруживать рак почки с чувствительностью 81 % и специфичностью 83 % (AUC 0,860) [26]. Система *miR-193a-3p*, *-362*, *-572*, *-28-5p* и *-378*, исследованная на выборке из 79 образцов, характеризуется чувствительностью 80 % и специфичностью 71 % (AUC ~ 0,8) [27]. При использовании панели из 2 миРНК (*miR-141* и *-1233*) показано, что скПКР может диагностироваться с чувствительностью 100 % и специфичностью 73 % [28]. В нашей работе определены 2 системы, которые характеризуются достаточно высокими показателями чувствительности и специфичности (90 и 94 % соответственно), а также величиной AUC более 0,9.

Заключение

Таким образом, эти системы могут быть рекомендованы для дальнейшей валидации на расширенных выборках образцов для разработки методов ранней диагностики скПКР на основе биопсийного материала, который уже сейчас широко используется для идентификации злокачественных опухолей почки малого размера зарубежом [29]. Полученные результаты в дальнейшем лягут в основу разработки метода неинвазивной диагностики.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interests. Authors declare no conflict of interest.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Vasudev N.S., Selby P.J., Banks R.E. Renal cancer biomarkers: the promise of personalized care. BMC Med 2012;10:112. DOI: 10.1186/1741-7015-10-112. PMID: 23016578.
2. Cairns P. Renal cell carcinoma. Cancer Biomark 2011;9(1–6):461–73. DOI: 10.3233/CBM-2011-0176. PMID: 22112490.
3. Rydzanicz M., Wrzesinski T., Bluyssen H.A., Wesoły J. Genomics and epigenomics of clear cell renal cell carcinoma: recent developments and potential applications. Cancer Lett 2013;341(2):111–26. DOI: 10.1016/j.canlet.2013.08.006. PMID: 23933176.

4. Randall J.M., Millard F., Kurzrock R. Molecular aberrations, targeted therapy, and renal cell carcinoma: current state-of-the-art. *Cancer Metastasis Rev* 2014;33(4):1109–24. DOI: 10.1007/s10555-014-9533-1. PMID: 25365943.
5. Каприн А.Д., Старинский В.В., Петрова Г.В. Состояние онкологической помощи населению России в 2015 году. М.: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИРЦ» Минздрава России, 2016. 236 с. [Kaprin A.D., Starinskiy V.V., Petrova G.V. State of oncological care in Russia in 2015. Moscow: MNIOI im. P.A. Gertsena – filial FGBU “NMIRTS” Minzdrava Rossii, 2016. 236 p. (In Russ.)].
6. Jones P.A. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nat Rev Genet* 2012;13(7):484–92. DOI: 10.1038/nrg3230. PMID: 22641018.
7. Vrba L., Muñoz-Rodríguez J.L., Stampfer M.R., Futscher B.W. miRNA gene promoters are frequent targets of aberrant DNA methylation in human breast cancer. *PLoS One* 2013;8(1):e54398. DOI: 10.1371/journal.pone.0054398. PMID: 23342147.
8. Kunj T., Godnic I., Ferdin J. et al. Epigenetic regulation of microRNAs in cancer: an integrated review of literature. *Mutat Res* 2011;717(1–2):77–84. DOI: 10.1016/j.mrfmmm.2011.03.008. PMID: 21420983.
9. Piletić K., Kunj T. MicroRNA epigenetic signatures in human disease. *Arch Toxicol* 2016;90(10):2405–19. DOI: 10.1007/s00204-016-1815-7. PMID: 27557899.
10. Baylin S.B., Jones P.A. Epigenetic determinants of cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2016;8(9):a019505. DOI: 10.1101/cshperspect.a019505. PMID: 27194046.
11. Рыков С.В., Ходырев Д.С., Пронина И.В. и др. Новые гены микроРНК, подверженные метилированию в опухолях легкого. *Генетика* 2013;49(7):896–901. [Rykov S.V., Khodyrev D.S., Pronina I.V. et al. Novel miRNA genes methylated in lung tumors. *Genetika* = *Genetics* 2013;49(7):896–901. (In Russ.)]. DOI: 10.7868/S0016675813070114.
12. Логинов В.И., Бурденный А.М., Пронина И.В. и др. Идентификация новых генов микроРНК, гиперметилированных при раке молочной железы. *Молекулярная биология* 2016;50(5):797–802. [Loginov V.I., Burdenny A.M., Pronina I.V. et al. Novel miRNA genes hypermethylated in breast cancer. *Molekulyarnaya biologiya* = *Molecular Biology* 2016;50(5):797–802. (In Russ.)]. DOI: 10.7868/S0026898416050104.
13. Pronina I.V., Loginov V.I., Burdenny A.M. et al. DNA methylation contributes to deregulation of 12 cancer-associated microRNAs and breast cancer progression. *Gene* 2017;604:1–8. DOI: 10.1016/j.gene.2016.12.018. PMID: 27998789.
14. Логинов В.И., Рыков С.В., Фридман М.В., Брага Э.А. Метилирование генов микроРНК и онкогенез. *Биохимия* 2015;80(2):184–203. [Loginov V.I., Rykov S.V., Fridman M.V., Braga E.A. Methylation of miRNA genes and oncogenesis. *Biokhimiya* = *Biochemistry* 2015;80(2):184–203. (In Russ.)]. DOI: 10.1134/S0006297915020029.
15. Береснева Е.В., Рыков С.В., Ходырев Д.С. и др. Профиль метилирования группы генов микроРНК при светлоклеточном почечно-клеточном раке; связь с прогрессией рака. *Генетика* 2013;49(3):366–75. [Beresneva E.V., Rykov S.V., Khodyrev D.S. et al. Methylation profile of group of miRNA genes in clear cell renal cell carcinoma; involvement in cancer progression. *Genetika* = *Genetics* 2013;49(3):366–75. (In Russ.)]. DOI: 10.1134/S1022795413030034. PMID: 23755536.
16. Береснева Е.В., Логинов В.И., Ходырев Д.С. и др. Гиперметилированные гены микроРНК как потенциальные маркеры светлоклеточного рака почки. *Клиническая лабораторная диагностика* 2017;62(1):13–8. [Beresneva E.V., Loginov V.I., Khodyrev D.S. et al. The hyper-methylated genes microRNA as potential markers of clear-cell carcinoma of kidney. *Clinicheskaya laboratornaya diagnostika* = *Clinical Laboratory Diagnostics* 2017;62(1):13–8. (In Russ.)]. DOI: 10.18821/0869-2084-2017-62-1-13-18.
17. Sobin L.H., Gospodarowicz M.K., Wittekind Ch. International Union against Cancer. TNM classification of malignant tumours. 7th edn, 2009. Chichester, West Sussex, UK; Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell, 2010. Pp. 332. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nlmcatalog/101511218>.
18. Loginov V.I., Dmitriev A.A., Senchenko V.N. et al. Tumor suppressor function of the *SEMA3B* gene in human lung and renal cancers. *PLoS One* 2015;10(5):e0123369. DOI: 10.1371/journal.pone.0123369. PMID: 25961819.
19. Lee K.H., Lotterman C., Karikari C. et al. Epigenetic silencing of MicroRNA miR-107 regulates cyclin-dependent kinase 6 expression in pancreatic cancer. *Pancreatology* 2009;9(3):293–301. DOI: 10.1159/000186051. PMID: 19407485.
20. Yang C., Cai J., Wang Q. et al. Epigenetic silencing of miR-130b in ovarian cancer promotes the development of multidrug resistance by targeting colony-stimulating factor 1. *Gynecol Oncol* 2012;124(2):325–34. DOI: 10.1016/j.ygyno.2011.10.013. PMID: 22005523.
21. Li H.P., Huang H.Y., Lai Y.R. et al. Silencing of miRNA-148a by hypermethylation activates the integrin-mediated signaling pathway in nasopharyngeal carcinoma. *Oncotarget* 2014;5(17):7610–24. DOI: 10.18632/oncotarget.2282. PMID: 25277193.
22. Long X.R., He Y., Huang C., Li J. MicroRNA-148a is silenced by hypermethylation and interacts with DNA methyltransferase 1 in hepatocellular carcinogenesis. *Int J Oncol* 2014;44(6):1915–22. DOI: 10.3892/ijo.2014.2373. PMID: 24714841.
23. Sun J., Song Y., Wang Z. et al. Clinical significance of promoter region hypermethylation of microRNA-148a in gastrointestinal cancers. *Onco Targets Ther* 2014;7:853–63. DOI: 10.2147/OTT.S60888. PMID: 24920927.
24. Cao H., Liu Z., Wang R. et al. miR-148a suppresses human renal cell carcinoma malignancy by targeting AKT2. *Oncol Rep* 2017;37(1):147–54. DOI: 10.3892/or.2016.5257. PMID: 27878305.
25. Kim E.A., Kim T.G., Sung E.G. et al. miR-148a increases the sensitivity to cisplatin by targeting Rab14 in renal cancer cells. *Int J Oncol* 2017;50(3):984–92. DOI: 10.3892/ijo.2017.3851. PMID: 28098870.
26. Redova M., Poprach A., Nekvindova J. et al. Circulating miR-378 and miR-451 in serum are potential biomarkers for renal cell carcinoma. *J Transl Med* 2012;10:55. DOI: 10.1186/1479-5876-10-55. PMID: 22440013.
27. Wang C., Hu J., Lu M. et al. A panel of five serum miRNAs as a potential diagnostic tool for early-stage renal cell carcinoma. *Sci Rep* 2015;5:7610. DOI: 10.1038/srep07610. PMID: 25556603.
28. Yadav S., Khandelwal M., Seth A. et al. Serum microRNA expression profiling: potential diagnostic implications of a panel of serum microRNAs for clear cell renal cell cancer. *Urology* 2017;104:64–9. DOI: 10.1016/j.urol.2017.03.013. PMID: 28336290.
29. Marconi L., Dabestani S., Lam T.B. et al. Systematic review and meta-analysis of diagnostic accuracy of percutaneous renal tumour biopsy. *Eur Urol* 2016;69:660–73. DOI: 10.1016/j.eururo.2016.04.027. PMID: 27157997.

Статья поступила: 29.06.2017. Принята в печать: 21.08.2017.

Article received: 29.06.2017. Accepted for publication: 21.08.2017.